



# 転写因子Bach2によるB リンパ球分化制御機構の解明

著者	武藤 哲彦
雑誌名	東北医学雑誌
巻	121
号	2
ページ	184-187
発行年	2009-12
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/51447">http://hdl.handle.net/10097/51447</a>

## 転写因子 Bach2 による B リンパ球分化制御機構の解明

### Elucidation for the Mechanism of B Lymphoid Cell Differentiation Regulating by Transcription Factor Bach2

武 藤 哲 彦

東北大学大学院医学系研究科 生物化学分野

#### 1. はじめに

免疫応答で B 細胞は、抗原により活性化されると、抗体を産生・分泌する形質細胞へ最終分化を遂げる。その際に、IgM 型の形質細胞と、クラススイッチ応答を経て IgG, IgA もしくは IgE 型といった他のアイソタイプ抗体を産生・分泌する形質細胞へ分化する場合がある<sup>1)</sup> (図 1A)。この B 細胞に特有なクラススイッチ応答の実体は、抗体重鎖遺伝子に生じる DNA 組換えである。IgM 型の形質細胞は、抗原を認識する可変領域エクソンの直下に位置する IgM 型の定常領域エクソンを使用する。一方で、他のアイソタイプ抗体の定常領域エクソンは、IgM 型定常領域エクソンの下流にクラスターを成している。クラススイッチ応答では、このクラスター内部で DNA 組換えが生じ、遺伝子の一部が取り除かれる。その結果、IgG 型など定常領域をコードするエクソンが最も上流に配置され、クラススイッチ応答が完成する。この応答は、遺伝情報の改変を伴うため、場所とタイミングが厳密に制御される必要がある。それは、クラススイッチ応答に必須の酵素 AID の発現が一過性に誘導されることで規定される<sup>2)</sup>。この抗体のクラススイッチ応答は、「ある頻度で確率的におきる」とされてきた<sup>3)</sup>。そして、クラススイッチする形質細胞への分化を司る遺伝子ネットワークの構成がどのようなものか、それが如何に調節されるかという点は、未解決の問題であった。

#### 2. 転写因子 Bach2

転写因子 Bach2 は MafK などの小 Maf 因子とヘテロ二量体を形成し、Maf 認識配列 (Maf recognition element, MARE) と名付けられた 特異的な DNA 配列に結合し、標的遺伝子の転写を抑制する<sup>4)</sup>。Bach2 の発現は B 細胞特異的であり、幼若な B 細胞の分化段階

から成熟 B 細胞までは豊富であるが、形質細胞へ最終分化する過程で消失する<sup>5)</sup>。私たちは、Bach2 の生体内での機能を探る目的で *Bach2* 遺伝子ノックアウトマウスを作成し、表現型を解析した<sup>6)</sup>。*Bach2* ノックアウトマウスは、骨髄での B 細胞初期分化が正常であるのに対し、脾臓での後期分化が部分的に障害される。さらに、マウス血清中の抗体価を測定すると IgM 型の抗体価が、野生型マウスに比べて高いのに対し、IgG や IgA といった他のアイソタイプ抗体価が全て半分以下に低下する。そして、*Bach2* ノックアウトマウスに対して人為的に抗原を投与し、免疫応答を惹起しても、抗原特異的な IgG 型の抗体価は上昇しなかった (図 1B)。この結果は、クラススイッチ応答を経た形質細胞への分化に *Bach2* が関与することを強く示唆した。そこで、培養系で活性化した *Bach2* ノックアウト B 細胞における遺伝子発現の変化を定量 PCR で調べた。すると、AID の発現が殆ど誘導されなかった (図 2B)。逆に、転写因子 *Blimp-1* の発現が *Bach2* ノックアウト B 細胞で極端に誘導されることを明らかにした。私たちは *Blimp-1* 遺伝子が *Bach2* の直接標的遺伝子であり、B 細胞では *Bach2* が転写を抑制することを突き止めた<sup>7-9)</sup>。*Blimp-1* 遺伝子にはプロモーター領域と第 5 インtron 内に MARE が合計 2 か所存在し、この DNA 配列はヒトとマウスで種を超えて保存されていた。本来 *Blimp-1* 遺伝子の発現は、B 細胞では見られないが、形質細胞分化に伴って誘導される。*Blimp-1* を脾臓 B 細胞で異所性に発現させると形質細胞分化を誘導出来ること、B 細胞特異的に欠損させると形質細胞への分化が完全に停止することから、形質細胞の分化に必須の転写因子であるとされている<sup>10)</sup>。

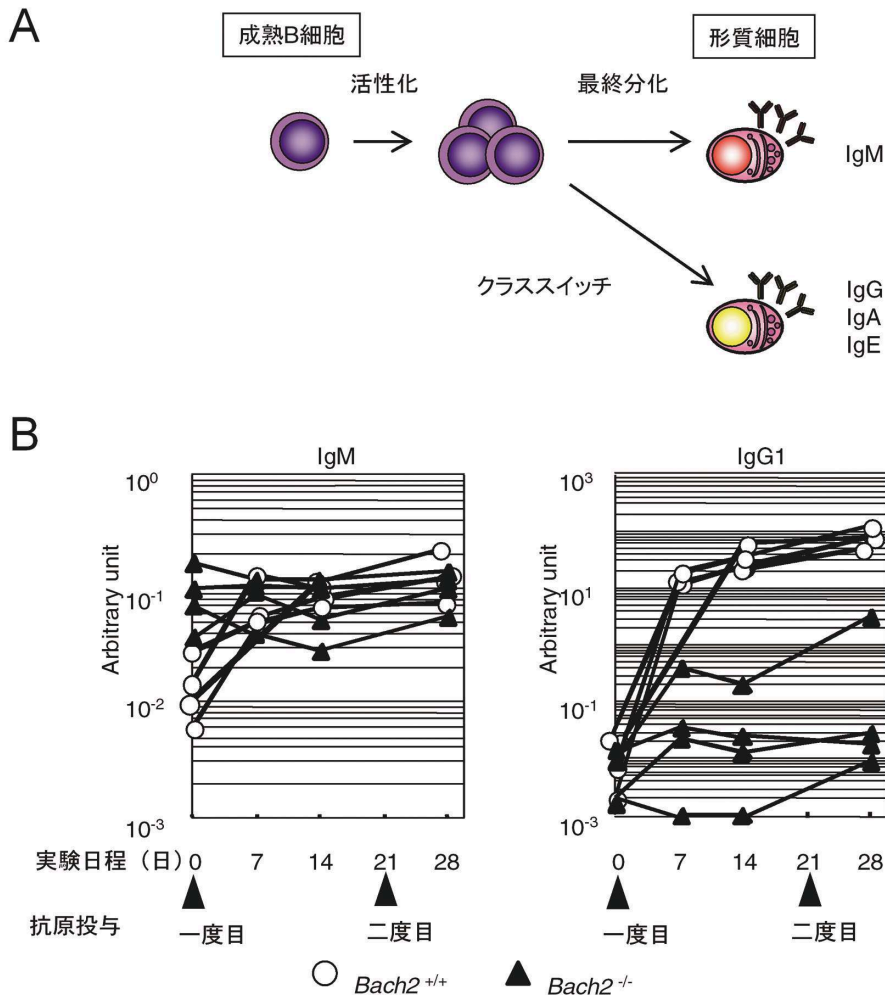


図1. (A) 成熟 B 細胞から形質細胞への最終分化 (B) 野生型マウス○と *Bach2* ノックアウトマウス●に対し、T 細胞依存的免疫抗原 NP-CGG を 0 日目と 21 日目に投与した。投与前、投与後 7 日目、14 日目および 28 日目の抗 NP-IgM と抗 NP-IgG1 の血清中の量を測定し、吸光度の相対値で示した。

### 3. *Bach2*, *Blimp-1* ダブル・ノックアウト B 細胞の解析

*Blimp-1* は形質細胞分化を促進する一方で、クラススイッチ応答を抑制する<sup>10)</sup>。このことから、活性化した *Bach2* ノックアウト B 細胞では、脱抑制的に高発現した *Blimp-1* の作用が、クラススイッチの障害を引き起こす原因と考えられた。この仮説を検証するために、*Bach2* ノックアウトマウスと B 細胞特異的 *Blimp-1* ノックアウトマウスを交配して、*Bach2*, *Blimp-1* ダブル・ノックアウトマウスを作出した。そして、同マウスから採取した脾臓 B 細胞を培養系でクラススイッチを誘導し、クラススイッチした細胞の出現頻度をフ

ローサイトメーターで測定した (図 2A)。すると、*Bach2* ノックアウト B 細胞では、クラススイッチした B 細胞は殆ど検出されないのに対して、ダブル・ノックアウト B 細胞ではクラススイッチした B 細胞が野生型 B 細胞と同等かそれ以上の頻度で検出された。LPS と IL-4 刺激で IgG1 クラスへ誘導した場合、そして LPS 単独刺激で IgG3 クラスへ誘導した場合、両方の実験系で *Bach2* ノックアウト B 細胞のクラススイッチ障害は、*Blimp-1* 遺伝子の発現を取り除くことで救済されるという結果を得た (図 2A)。この結果と合致するように、*AID* 遺伝子の発現もダブル・ノックアウト B 細胞では誘導された (図 2B)。すなわち、*Bach2* ノックアウト B 細胞の障害が *Blimp-1* を取り

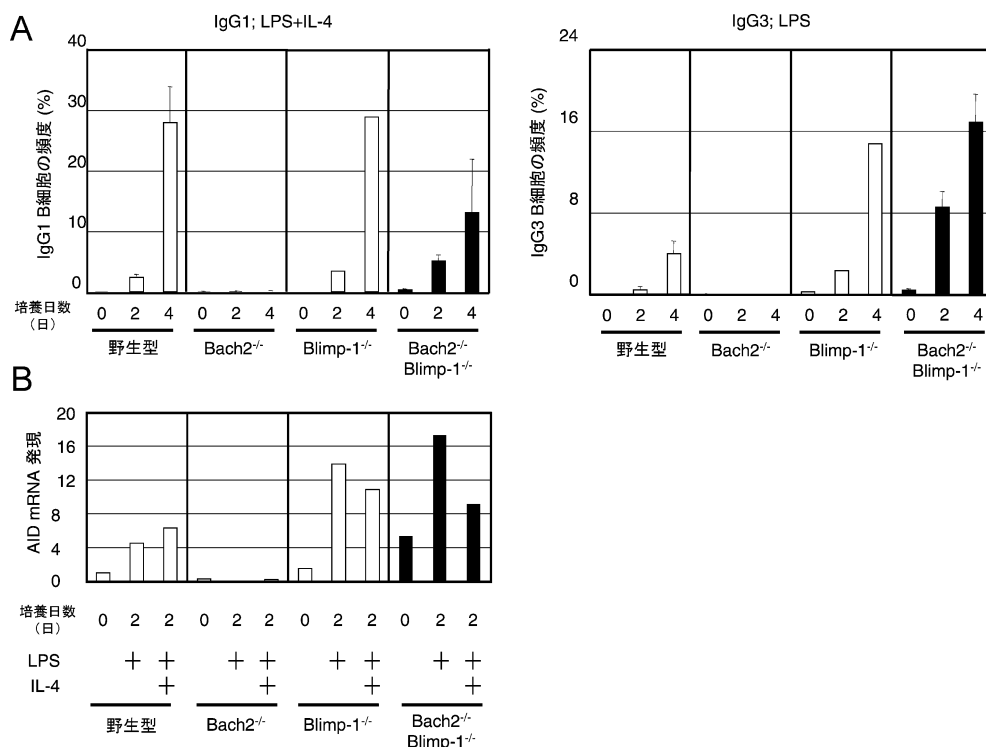


図2. (A) 野生型マウス, Bach2 ノックアウトマウス, Blimp-1 ノックアウトマウス, Bach2, Blimp-1 二重ノックアウトマウスの脾臓 B 細胞を培養系で刺激し, クラススイッチを誘導した. IgG1 クラスへは LPS と IL-4 刺激をおこない, IgG3 クラスへは LPS 刺激をおこなった. 培養初日, 2 日目および 4 日目の細胞を FACS 解析し, クラススイッチした細胞の頻度をグラフ化した. Bach2 ノックアウト B 細胞で見られるクラススイッチ障害は二重ノックアウト B 細胞で回復する. (B) (A) でおこなった培養 2 日目の細胞における AID mRNA 発現を定量 RT-PCR にて調べた. Bach2 ノックアウト B 細胞で見られる AID mRNA 発現の障害は二重ノックアウト B 細胞で回復する.

除くことにより救済されるという結果は, Blimp-1 のクラススイッチに対する抑制作用が, Bach2 ノックアウト B 細胞の障害の原因であることを明確に示している.

#### 4. Bach2 による *Blimp-1* 遺伝子抑制の生理的意義

Pax5 は B 細胞特異的な転写因子である. Pax5 は *Bach2* 遺伝子の転写を活性化する因子であり, *AID* 遺伝子の転写活性化も担う<sup>11)</sup>. 一方で *Pax5* 遺伝子は, *Blimp-1* の直接標的遺伝子として形質細胞分化過程では転写抑制される<sup>12)</sup>. これらの報告とこの度の実験結果を併せて, 図3のような遺伝子ネットワークが B 細胞のクラススイッチ応答する B 細胞への分化を制御すると考えている. クラススイッチする B 細胞では, Bach2 が十分に *Blimp-1* 遺伝子の発現を抑制す

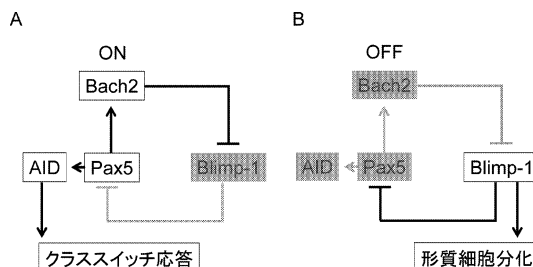


図3. (A) クラススイッチ応答時の遺伝子ネットワーク (B) 形質細胞分化時の遺伝子ネットワーク

るために *Pax5* 遺伝子発現は抑制されない. そこで Pax5 は *AID* 遺伝子の転写を活性化し, クラススイッチが実行される (図3A). それに対して, 形質細胞へ分化する細胞では, *Blimp-1* 遺伝子活性化は, Bach2 と *Pax5* 遺伝子発現の低下を招く. そして *AID* 遺伝子発現低下によってクラススイッチ応答が停止し,

Blimp-1 が形質細胞分化を誘導する (図 3B)。したがって、転写因子 Bach2 は B 細胞の活性化応答の遺伝子ネットワーク切換えを担う因子と位置付けられる。

## 5. おわりに

本研究から、Bach2 が制御する遺伝子ネットワークは、クラススイッチ応答を経た形質細胞への分化を調節することを明らかにしてきた。現在、国際高等教育機構 木村芳孝教授にご協力いただき、Bach2 が制御する遺伝子ネットワークを数学モデルでシミュレーションする試みにも取り組んでいる。

## 6. 謝 辞

本研究は、東北大学大学院医学系研究科生物化学分野 五十嵐和彦教授の御指導のもと、研究室の諸先生との共同研究にておこなわれています。また、Bach2 ノックアウトマウスの作出は、東北大学大学院医学系研究科 医化学分野 山本雅之教授との共同研究にておこなわれました。この場をお借りしまして深謝いたします。

## 文 献

- 1) Stavnezer, J., Guikema, J.E. and Schrader, C.E. (2008) *Annu. Rev. Immunol.*, **26**, 261-292.
- 2) Muramatsu, M., Nagaoka, H., Shinkura, R., et al. (2007) *Adv. Immunol.*, **94**, 1-36.
- 3) Hasbold, J., Corcoran, L.M., Tarlinton, D.M., et al. (2004) *Nat. Immunol.*, **5**(1), 55-63.
- 4) Oyake, T., Itoh, K., Motohashi, H., et al. (1996) *Mol. Cell. Biol.*, **16**(11), 6083-6095.
- 5) Muto, A., Hoshino, H., Madisen, L., et al. (1998) *EMBO. J.*, **17**(19), 5734-5743.
- 6) Muto, A., Tashiro, S., Nakajima, O., et al. (2004) *Nature.*, **429**(6991), 566-571.
- 7) Ochiai, K., Katoh, Y., Ikura, T., et al. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**(50), 38226-38234.
- 8) Ochiai, K., Muto, A., Tanaka, H., et al. (2008) *Int. Immunol.*, **20**(3), 453-460.
- 9) Igarashi, K., Ochiai, K. and Muto, A. (2007) *J. Biochem.*, **141**(6), 783-789.
- 10) Calame, K. (2008) *Curr. Opin. Immunol.*, **20**(3), 259-264.
- 11) Gonda, H., Sugai, M., Nambu, Y., et al. (2003) *J. Exp. Med.*, **198**(9), 1427-1437.
- 12) Lin, K.I., Angelin-Duclos, C., Kuo, T.C., et al. (2002) *Mol. Cell. Biol.*, **22**(13), 4771-4780.